

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 32 947.4
Anmeldetag: 06. Juli-2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Für das rodA-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen
Priorität: 12.09.2000 DE 100 44 943.3
IPC: C 12 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 06. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das rodA-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rodA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des
5 Zellteilungsproteins RodA aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

20 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1
dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die
Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,
enthält;

25 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
denen das rodA-Gen verstärkt ist.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,
- 5 die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.
- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
- 10 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller-Länge zu isolieren, die für das Zellteilungsprotein RodA kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu
- 15 isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des rodA-Gens aufweisen. Sie können ebenso als Sonde für sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ verwendet werden, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren, zu analysieren und zu bestimmen.
- 20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das Zellteilungsprotein RodA kodieren.
- 25 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit
- 30 einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es
5 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu
10 wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

15 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
20 biologischen Aktivität des Zellteilungsproteins RodA und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit
25 dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen..

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur
fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-
30 Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die

insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das rodA-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
5 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten bzw. Stämme.

10 Das neue, für das Zellteilungsprotein RodA kodierende
rodA-Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

Zur Isolierung des rodA-Gens oder auch anderer Gene von
C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
15 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
20 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032,
25 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326)
30 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich

- 5 besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten
- 10 langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467,
- 15 1977) beschrieben ist.

- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder
- 20 dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Die neue für das Gen *rodA* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der
- 25 vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *rodA*-Genproduktes dargestellt.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch
- 30 die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche
- 35 wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von

Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der

Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschr

5 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

10 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's

15 Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

20 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur

25 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

30 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des rodA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

5 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des
10 Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
15 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin
20 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei
25 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei
30 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift
35 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and

Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße rodA-Gen
5 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden
überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in
coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche
bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al.,
Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),
10 pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1
(Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den
kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGAl. Andere
Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4
(US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS
15 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1
(US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise
verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe
derer man das Verfahren der Genamplifikation durch
20 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es
beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur
Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons
beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige
25 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt
(typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum
replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise
pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)),
pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73
30 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA),
pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry
269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma
Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal
of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf
35 et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder

- pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode
- 5 der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivanan
- 10 (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.
- 15 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *rodA*-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls
- 20 regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des *rodA*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 25
- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
 - das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 30
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
 - das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 5 • das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759),
- 10 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lySE (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- 15 • das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- 20 • das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- 25 • das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des rodA-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- 10 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der
15 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer
20 niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im
25 allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren
30 vorteilhaft sein, neben der Überexpression des rodA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:

"Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind
5 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können
kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
(Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder
repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert
10 werden. Eine Zusammenfassung über bekannte
Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel
(Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik
(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch
von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen
15 (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der
20 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,
1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie
z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.
25 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren
wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische
Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

30 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige
Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,
Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und

Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die

5 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben

10 genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

15 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

20 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B.

Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff

25 haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird

30 normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958),

35 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit

anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- 10 Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 18. Mai 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapestester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli DH5amcr/pEC-XK99ErodAalex als DSM 14312.

- 15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt.
- 20 Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 30

Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer
Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

- 5 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
10 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
15 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
20 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 25 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
30 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des rodA-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1326 Basenpaaren, welches als rodA-Gen bezeichnet wurde. Das rodA-Gen kodiert für ein Protein von 441 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung des Shuttle- Expressionsvektors pEC-XK99ErodAalex zur Verstärkung des rodA-Gens in *C. glutamicum*

3.1 Klonierung des rodA-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum*

bekannten Sequenz des rodA-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

rodAex1:

5 5' ga tct aga-gtc aat tgt agg gag gtc tc 3'

rodAex2:

5' ct ctg cag-gag gga tgt gat tcg aat cg 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
10 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit
Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer
15 die Amplifikation eines 1388 bp großen DNA-Fragmentes, welches das rodA-Gen trägt. Außerdem enthält der Primer rodAex1 die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, und der Primer rodAex2 die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease PstI, die in der
20 oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind.

Das 1388 bp große rodA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und PstI gespalten und anschließend aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel
25. Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2 Konstruktion des Shuttle - Vektors pEC-XK99E

Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E konstruiert. Der
30 Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Kanamycin-Resistenzgen aph(3')-IIa

aus *Escherichia coli* (Beck et al. (1982), Gene 19: 327-336), den Replikationsursprung, den trc-Promotor, die Terminationsregionen T1 und T2, das lacI^q-Gen (Repressor des lac-Operons von *E.coli*) und eine

- 5 Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norrande, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) des Plasmids pTRC99A (Amann et al. (1988), Gene 69: 301-315).

- Der konstruierte *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle - Vektor pEC-XK99E wurde mittels Elektroporation (Liebl et al.,
10 1989, FEMS Microbiology Letters, 53:299-303) in *C. glutamicum* DSM5715 transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5 g/l Brain-Heart Infusion Bouillon, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und
15 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

- Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit der
20 Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

- Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde als pEC-XK99E (Figur 1) bezeichnet. Der durch Elektroporation des
25 Plasmides pEC-XK99E in den *C. glutamicum*-Stamm DSM5715 erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99E genannt und als DSM13455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

- 30 3.3 Klonierung von *rodA* in den *E. coli*-*C. glutamicum* Shuttle Vektor pEC-XK99E

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle-Vektor pEC-XK99E verwendet. DNA

dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

Das in Beispiel 3.1 beschriebene, mittels PCR gewonnene und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und PstI gespaltene ca. 1380 bp große rodA-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-XK99E gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5amcr (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und PstI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pEC-XK99ErodAalex genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid pEC-XK99ErodAalex

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-XK99ErodAalex unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5

g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

- 5 Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und PstI geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese
10 überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99ErodAalex genannt.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

- Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm
15 DSM5715/pEC-XK99ErodAalex wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin
20 (25 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

- 5 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
 (NH ₄) ₂ SO ₄	 25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die
5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO₃.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80%
10 Luftfeuchte.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	11,3	13,02
DSM5715/pEC- XK99ErodAalex	12,6	14,15

10

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-XK99E

Figur 2: Karte des Plasmids pEC-XK99ErodAalex

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

Kan:	Kanamycin Resistenz-Gen ϕ ph(3')-IIa aus Escherichia coli
HindIII	Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII
XbaI	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI
PstI	Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI
Ptrc	trc-Promotor
T1	Terminationsregion T1
T2	Terminationsregion T2

per	Replikationseffektor per
rep	Replikationsregion rep des Plasmides pGA1
lacIq	lacIq-Repressor des lac-Operons von Escherichia coli
rodA	kloniertes rodA-Gen .

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das rodA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000515 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1761

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (238)..(1560)

<223> rodA-Gen

25

<400> 1

gaatgaagct ggcaccttgt cactcaagga atcctgtgaa aacggtacgt ctttcaaatt 60

30

ggatgattta ccggcatctg ttccgggtag tgtcgcagga ttaccgtctg ggctgtatga 120

cgagggtccag gcgcaaatgc aacggctggc tgctcaagct ttgccagtgt gcgtgaactt 180

agaagtaaca accggtggcg atagaaacga acccgagatc aattgtaggg aggtctc 237

35

atg	aac	acg	ctt	gaa	cga	tta	aag	ctt	cgt	cgc	acg	gaa	atg	tgg	ctg	285
Met	Asn	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr	Glu	Met	Trp	Leu	
1				5					10					15		

40

ctg	ata	ctt	gcc	aca	ctc	gtt	gtg	tgc	atc	atg	ttc	atc	agc	ctc	gag	333
Leu	Ile	Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Ile	Met	Phe	Ile	Ser	Leu	Glu	
			20					25					30			

45

ctg	gcc	atg	ggc	aat	gag	ttg	ggt	acc	cat	att	ttg	atg	ctg	atg	ggc	381
Leu	Ala	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Gly	Thr	His	Ile	Leu	Met	Leu	Met	Gly	
		35					40					45				

50

gga	tat	atc	ggt	atc	ttc	atc	gtc	gcg	cac	cta	gcc	atg	gca	tgg	gtg	429
Gly	Tyr	Ile	Gly	Ile	Phe	Ile	Val	Ala	His	Leu	Ala	Met	Ala	Trp	Val	
	50					55					60					

gcg	ccg	ttt	gct	gat	caa	atc	atg	ctg	cct	gtg	gtg	gcg	gtg	ctc	aat	477
Ala	Pro	Phe	Ala	Asp	Gln	Ile	Met	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Val	Leu	Asn	
65					70				75					80		

55

ggc	att	ggt	ttg	gtg	atg	att	tat	cgc	ctt	gat	gag	gcc	acg	ggc	tac	525
Gly	Ile	Gly	Leu	Val	Met	Ile	Tyr	Arg	Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	Gly	Tyr	
				85					90					95		

	agc acg gtc aat agc caa ttg atg tgg acg gtt gtt ggc gtc acg ctg	573
	Ser Thr Val Asn Ser Gln Leu Met Trp Thr Val Val Gly Val Thr Leu	
	100 105 110	
5	atg gtg gct gtg ttg ttg ctg ttg cgt gat tac aag tcg ctt tcg cgt	621
	Met Val Ala Val Leu Leu Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Ser Leu Ser Arg	
	115 120 125	
10	tat tcc tac ctc ctc ggt gtg gtg ggc atc gtg ctg ctg gcg ctg cct	669
	Tyr Ser Tyr Leu Leu Gly Val Val Gly Ile Val Leu Leu Ala Leu Pro	
	130 135 140	
15	ctc gtg tgg ccg cag cca ggc ggc gtg gaa gcc cgc atc tgg att tgg	717
	Leu Val Trp Pro Gln Pro Gly Gly Val Glu Ala Arg Ile Trp Ile Trp	
	145 150 155 160	
20	ctt gga cct ttc tcc atc cag cca ggt gag ttc tcc aag att ttg ctg	765
	Leu Gly Pro Phe Ser Ile Gln Pro Gly Glu Phe Ser Lys Ile Leu Leu	
	165 170 175	
25	ctg ctg ttc ttt gct cag ctg cta gcc acc aag cgt gct ttg ttt act	813
	Leu Leu Phe Phe Ala Gln Leu Leu Ala Thr Lys Arg Ala Leu Phe Thr	
	180 185 190	
30	gtt gcg ggc tac cgt ttc ctc ggc atg gat ttc cct cgt ttg cgt gac	861
	Val Ala Gly Tyr Arg Phe Leu Gly Met Asp Phe Pro Arg Leu Arg Asp	
	195 200 205	
35	ctc gcg ccg att ctt gtg gtg tgg gcg ttg gct att ttg atc atg gct	909
	Leu Ala Pro Ile Leu Val Val Trp Ala Leu Ala Ile Leu Ile Met Ala	
	210 215 220	
40	ggc gcc aac gac ttc ggt cct gca ctg ctg ctt ttc act acc gtt ttg	957
	Gly Ala Asn Asp Phe Gly Pro Ala Leu Leu Leu Phe Thr Thr Val Leu	
	225 230 235 240	
45	gcc atg gtg tac ctg gct acc ggc cgt ggt tcc tgg ctg ttg att ggt	1005
	Ala Met Val Tyr Leu Ala Thr Gly Arg Gly Ser Trp Leu Leu Ile Gly	
	245 250 255	
50	gct gtg ttg gtg gct gtc ggc gcg ttc gcg gtg tac caa gtt tca agc	1053
	Ala Val Leu Val Ala Val Gly Ala Phe Ala Val Tyr Gln Val Ser Ser	
	260 265 270	
55	aag att cag gaa cgc gtg caa aac ttc gtg gat cct gtg gcc cac tat	1101
	Lys Ile Gln Glu Arg Val Gln Asn Phe Val Asp Pro Val Ala His Tyr	
	275 280 285	
60	gac acc acc ggt tac cag ctg tcc cag tcc ttg ttt ggc atg agt tgg	1149
	Asp Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ser Gln Ser Leu Phe Gly Met Ser Trp	
	290 295 300	
65	ggc gga atc acc ggc acc ggc att ggt cag ggt tac ccc aac atg atc	1197
	Gly Gly Ile Thr Gly Thr Gly Ile Gly Gln Gly Tyr Pro Asn Met Ile	
	305 310 315 320	
70	cct gtc gtg cac tcg gac ttc att ctc gca gcc att ggt gag gag ctt	1245
	Pro Val Val His Ser Asp Phe Ile Leu Ala Ala Ile Gly Glu Glu Leu	
	325 330 335	

5 ggt ctg att ggc ctg gcg gcc atc atc gtg ctg ttt ggt gtg ttt gtc 1293
 Gly Leu Ile Gly Leu Ala Ala Ile Ile Val Leu Phe Gly Val Phe Val
 340 345 350
 acc cgc ggt atg cgc acc gct acc ctg gct cgt gac agc tac gga aag 1341
 Thr Arg Gly Met Arg Thr Ala Thr Leu Ala Arg Asp Ser Tyr Gly Lys
 355 360 365
 10 ctc gtg gca tct ggt ctg tcg atg acc atc atg atc cag att ttc gtc 1389
 Leu Val Ala Ser Gly Leu Ser Met Thr Ile Met Ile Gln Ile Phe Val
 370 375 380
 15 gtc gtg gca ggt att tct tca ctg atg ccc atg aca ggt ttg acc act 1437
 Val Val Ala Gly Ile Ser Ser Leu Met Pro Met Thr Gly Leu Thr Thr
 385 390 395 400
 20 ccg ttt atg tcc cag ggt ggt tca tcc ctg atg gct aac tac att ctg 1485
 Pro Phe Met Ser Gln Gly Gly Ser Ser Leu Met Ala Asn Tyr Ile Leu
 405 410 415
 atg gcc atc atc ttg cgt att tct gac agt gcc cgc cga cct gtc atg 1533
 Met Ala Ile Ile Leu Arg Ile Ser Asp Ser Ala Arg Arg Pro Val Met
 420 425 430
 25 tcc aag caa gca tcg gag gtg gct gcg tgaaccgctc gattcgaatc 1580
 Ser Lys Gln Ala Ser Glu Val Ala Ala
 435 440
 30 acatccctct tctctttgct cctgatcttg gtgctcgtag caaacctcac ctggattcag 1640
 gcttttaggg acgatgatct tgctcagaac ccaactgaacg cacgtgggttt cctggaggcg 1700
 aagtccactc cgcgtggaca gatttcaact ggtggccaag tactcgcaga gtcctcccag 1760
 35 g 1761
 40 <210> 2
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 45 <400> 2
 Met Asn Thr Leu Glu Arg Leu Lys Leu Arg Arg Thr Glu Met Trp Leu
 1 5 10 15
 Leu Ile Leu Ala Thr Leu Val Val Ser Ile Met Phe Ile Ser Leu Glu
 20 25 30
 50 Leu Ala Met Gly Asn Glu Leu Gly Thr His Ile Leu Met Leu Met Gly
 35 40 45
 55 Gly Tyr Ile Gly Ile Phe Ile Val Ala His Leu Ala Met Ala Trp Val
 50 55 60
 Ala Pro Phe Ala Asp Gln Ile Met Leu Pro Val Val Ala Val Leu Asn
 65 70 75 80

	Gly	Ile	Gly	Leu	Val	Met	Ile	Tyr	Arg	Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	Gly	Tyr	
					85					90					95		
5	Ser	Thr	Val	Asn	Ser	Gln	Leu	Met	Trp	Thr	Val	Val	Gly	Val	Thr	Leu	
				100					105					110			
	Met	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp	Tyr	Lys	Ser	Leu	Ser	Arg	
			115					120					125				
10	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Val	Val	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	
		130					135					140					
	Leu	Val	Trp	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Val	Glu	Ala	Arg	Ile	Trp	Ile	Trp	
	145					150					155					160	
15	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Ile	Gln	Pro	Gly	Glu	Phe	Ser	Lys	Ile	Leu	Leu	
					165					170					175		
	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Gln	Leu	Leu	Ala	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Phe	Thr	
20				180					185					190			
	Val	Ala	Gly	Tyr	Arg	Phe	Leu	Gly	Met	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Arg	Asp	
			195					200					205				
25	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Val	Val	Trp	Ala	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Met	Ala	
		210					215					220					
	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Thr	Thr	Val	Leu	
	225					230					235					240	
30	Ala	Met	Val	Tyr	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Gly	Ser	Trp	Leu	Leu	Ile	Gly	
					245					250					255		
	Ala	Val	Leu	Val	Ala	Val	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Tyr	Gln	Val	Ser	Ser	
35				260					265					270			
	Lys	Ile	Gln	Glu	Arg	Val	Gln	Asn	Phe	Val	Asp	Pro	Val	Ala	His	Tyr	
			275					280					285				
40	Asp	Thr	Thr	Gly	Tyr	Gln	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Gln	Gly	Tyr	Pro	Asn	Met	Ile	
	305					310					315				320		
45	Pro	Val	Val	His	Ser	Asp	Phe	Ile	Leu	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Glu	Leu	
					325					330				335			
	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Val	
50				340					345					350			
	Thr	Arg	Gly	Met	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Ser	Tyr	Gly	Lys	
			355					360					365				
55	Leu	Val	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Met	Thr	Ile	Met	Ile	Gln	Ile	Phe	Val	
		370					375					380					
	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ser	Leu	Met	Pro	Met	Thr	Gly	Leu	Thr	Thr	
	385					390					395					400	

Pro Phe Met Ser Gln Gly Gly Ser Ser Leu Met Ala Asn Tyr Ile Leu
405 410 415

5 Met Ala Ile Ile Leu Arg Ile Ser Asp Ser Ala Arg Arg Pro Val Met
420 425 430

Ser Lys Gln Ala Ser Glu Val Ala Ala
435 440

10

<210> 3
<211> 28
15 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
20 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
rodAex1

<400> 3
gatctagagt caattgtagg gaggtctc 28

25

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
rodAex2

35 <400> 4
ctctgcagga gggatgtgat tcgaatcg 28

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rodA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Zellteilungsproteins RodA aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das rodA-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Escherichia coli DH5 α mcr/pEC-XK99ErodAalex als DSM14312 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das rodA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das rodA-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das rodA-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für
das das Polynukleotid rodA kodiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
16.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 16.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 16.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 5 16.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 16.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 16.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 16.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 16.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15 16.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 16.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 20 16.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 16.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 25 16.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 16.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 verstärkt bzw. überexprimiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 17.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase
kodierende Gen pgi,
- 17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 17.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
18. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10
bis 17, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm
DSM5715/pEC-XK99ErodAalex einsetzt.
21. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für das Zellteilungsprotein RodA
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
rodA-Gens aufweisen, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid,
enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den
Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden
einsetzt.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro
arrays oder DNA-chips einsetzt.

53127 (11)

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das rodA-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

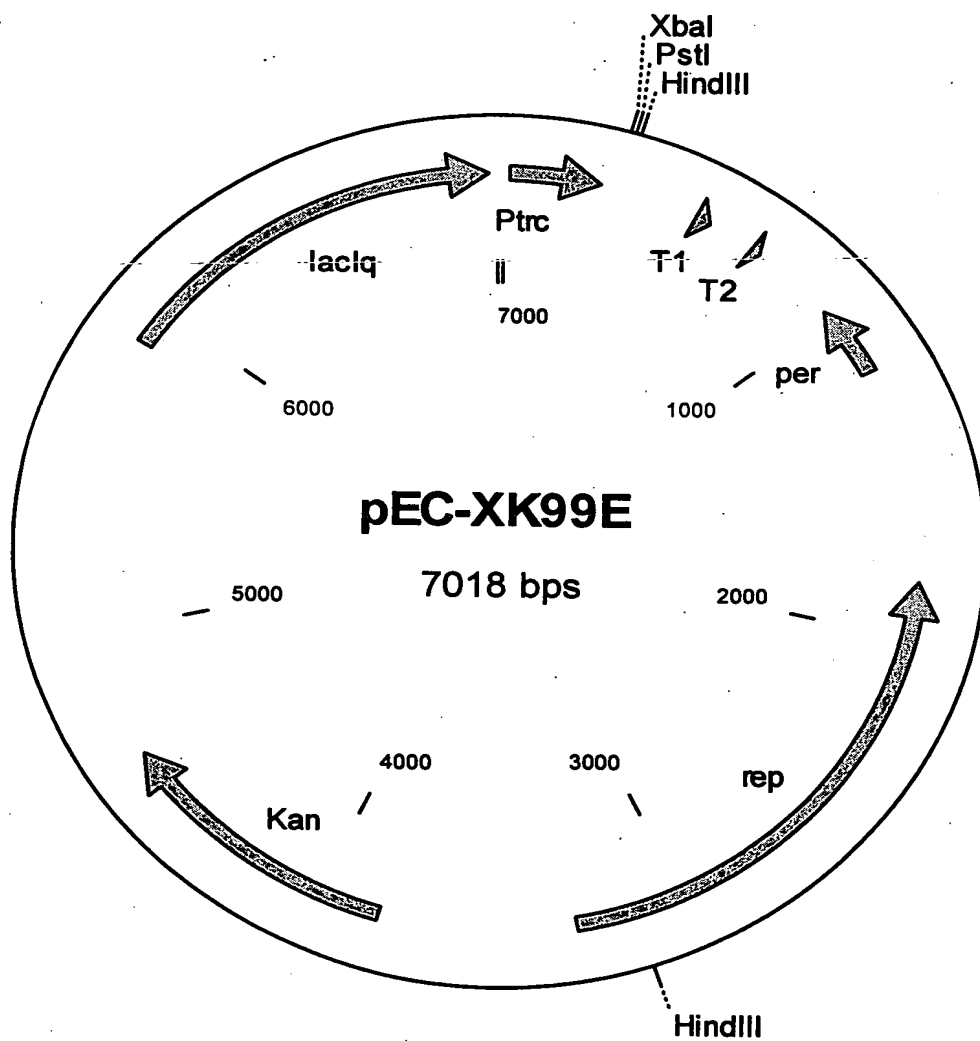
Figur 1: Karte des Plasmides pEC-XK99E

5

10

15

20



Figur 2: Karte des Plasmides pEC-XK99ErodAalex

